

갈화(葛花)와 진피(陳皮) 추출물로 이루어진 복합물의 에스트로젠 활성과 파골세포 분화억제효과

조호성^{1#}, 이보영¹, 이원경¹, 이준호¹, 박동준¹, 최창일¹, 진무현¹, 노석선², 주영승^{3*}

1 : LG생활건강 기술원, 2 : 대전대학교 한의과대학 한의학과, 3 : 우석대학교 한의과대학 본초학교실

The effects of a Mixture of Puerariae Flos Extract and Citri Unshius Pericarpium Extract on Estrogenic Activities and Osteoclastogenesis

Hosong Cho^{1#}, Boyoung Lee¹, Won Kyung Lee¹, Jun Ho Lee¹, Dongjun Park¹
Changil Choi¹, Mu Hyun Jin¹, Seok-Seon Roh², Young-Sung Ju^{3*}

1 : LG Household & Healthcare Research Park

2 : Department of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University

3 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Woosuk University

ABSTRACT

Objectives : In this study, we examined the estrogenic activities and anti-osteoclastogenesis effects of PCE17, a mixture of PE (an extract of Puerariae Flos), and CE (an extract of Citri Unshius Pericarpium).

Methods : The estrogenic effect of PCE17, PE and CE were examined by ER- β /ERE reporter gene assay and proliferation assay in 293 T and MCF-7 cells. The expression of estrogen-responsive gene and protein were checked by Real Time-PCR (RT-PCR) and Western blotting in MCF-7 cells. Inhibitory effect of PCE17, PE and CE on RANKL-induced osteoclast differentiation were evaluated by TRAP staining and RT-PCR in primary osteoclast precursors from rat bone marrow cells.

Results : PCE17 and PE bind to ERs (estrogen receptors) and show estrogenic activities in 293T cells. They also stimulated the proliferation of MCF-7 cells and increased the expression of ER response gene, pS2, Tectorigenin, an active ingredient of PE, shows similar estrogenic activities in MCF-7 cells. PCE17 and CE inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis in rat primary osteoclast precursor cells and down-regulated the osteoclast-specific genes of Nfatc1, Ctsk, and Acp5.

Conclusions : In conclusion, PCE17 may have therapeutic potential in cases of menopause and osteoporosis.

Key words : PCE17, Puerariae Flos, Citri Unshius Pericarpium, Estrogenic Activities, Anti-osteoclastogenesis

I. 서 론

폐경 여성은 호르몬 불균형과 에스트로젠 분비가 감소함에 따라 혈관 운동 증상, 비뇨기성 위축, 골다공증, 심혈관 질환, 심리적 불만 등 신체 전반에 걸쳐 변화를 겪는다¹⁻²⁾. 에스트

로젠 대체 요법은 갱년기 여성들의 일반적인 치료법이지만, 에스트로젠의 장기간 노출은 유방암, 자궁내막암, 고혈압, 혈전증의 위험을 증가시킬 수 있다³⁻⁵⁾. 최근 에스트로젠 치료를 대체하고 여성의 폐경 증상 관리를 돕기 위한 노력의 일환으로 에스트로젠과 유사한 기능을 가지고 있는 것으로 알려진 여러

*Corresponding author : Young-Sung Ju, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Woosuk University, 61, Seonneomeo 3-gil, Wansan-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 54986, Republic of Korea.

· Tel : +82-63-290-9027 · Fax : +82-63-291-1240 · E-mail : jys9875@woosuk.ac.kr

#First author : Hosong Cho, LG Household & Healthcare Research Park, 70, Magokjungang 10-ro, Gangseo-gu, Seoul 07795, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-6980-1711 · Fax : +82-2-6980-1602 · E-mail : hscho@lghnh.com

· Received : 07 April 2020 · Revised : 11 May 2020 · Accepted : 25 May 2020

식물성 에스트로겐에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다⁶⁻⁷⁾.

한의학에서 갱년기 질환은 六經辨證인 少陽經證에 해당되며 口苦, 咽乾, 目眩, 胸脇苦滿, 寒熱往來를 주 증상으로 하고 있다. 상용되는 한약재 중에서 갈화(葛花)는 칩의 꽃으로 이소플라본이 풍부하며 性味가 甘涼하고 脾胃에 歸經하는 解表藥중 發散風熱藥에 속하며, 항암 활동, 항산화 활동, 알코올 해독 작용을 촉진하는 것으로 알려져 있다⁸⁻¹¹⁾. 갈화(葛花)의 대표적 이소플라본은 tectorigenin-7-oxylosylglucoside, tectoridin 및 tectorigenin¹²⁻¹³⁾ 등이며, tectorigenin은 에스트로겐 수용체- α (ER- α)와 에스트로겐 수용체- β (ER- β)에 결합하지만, 호르몬 치료에 이용하는 estradiol과 달리 ER- β 와 상대적 결합 친화력이 ER- α 에 비해 상당히 높다¹⁴⁾. 진피(陳皮)는 한국 감귤류 과일의 일종으로 性味가 辛苦溫하고 脾肺에 歸經하는 理氣藥에 속한다¹⁵⁾. 본 실험적 연구에서 갈화(葛花)의 涼한 성질과 진피(陳皮)의 溫한 성질을 통하여 寒熱往來의 발현 주증상인 안면홍조에 대처할 수 있는 가능성을 알아보고자 하며, 또한 두 가지 약재 모두 부수적으로 발생할 개연성을 가지고 있는 소화 장애에 대하여 소화기관 관련 경락(脾)에 歸經하는 효능이 갱년기에 나타나는 호르몬역조현상의 결과인 골다공증에 대한 예방 효과를 알아보고자 선정하였다.

또한, 저자의 이전 동물시험¹⁶⁻¹⁷⁾에서 안면홍조와 골다공증에 효과적이었던 PCE17과, 갈화(葛花) 및 진피(陳皮) 각각에 대하여 세포수준에서 에스트로겐의 활성과 파골세포 분화억제에 대한 정확한 기전과 관여인자를 파악하고자 하였다. 이를 위해 에스트로겐 수용체 결합과 활성모델과 RANKL 유도 파골세포 분화 모델을 이용하여, 실험한 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시료

갈화(葛花-식물명 칩의 꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃, Puerariae Flos)는 중국산으로 (주)휴먼허브에서 구입하여 SK 바이오랜드에서 70도, 70% 주정으로 heating mantle를 이용하여 4시간, 2시간 2회 농축 추출하였으며 추출수율은 25%이었다. 갈화(葛花)농축물에 텍스트린을 2:1 비율로 혼합, 분말화 하여 PCE17 복합물 제조 시 정확한 용량과 비율을 유지하도록 하였다. 진피(陳皮-식물명 귤나무의 열매껍질, Citri Unshius Pericarpium)는 국산으로 (주)휴먼허브에서 구입하였으며 물로 1시간동안 끓인 후 농축 한 결과, 추출수율은 27.5%이었다. 진피 농축액은 건조 분말화 하여 단독 또는 PCE17 복합물의 제조에 사용하였다. 또한 복합물 PCE17의 혼합비율은 이전 문헌에서 실시한 각각 한약재 내 지표성분의 복용량 예외¹⁸⁻¹⁹⁾ 본 저자의 이전 동물시험에서 확인한 복합물 효능용량 내 혼합비율에 맞춰 갈화(葛花)추출물 분말과 진피(陳皮)추출물 분말을 1.3:1로 혼합하였으며 SK바이오랜드(안산)에서 제조하였다. Tectorigenin, 17 β -estradiol(E2) 및 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, 미국)사의 제품을 사용하였다.

2. 고성능 액체 크로마토그래피 분석

갈화(葛花)는 tectorigenin, tectoridin, tectorigenin 7-Oxylosylglucoside을, 진피(陳皮)는 hesperidin을 주요 성분으로 함유하고 있다. 본 시험에서는 사용한 PCE17, 갈화(葛花)추출물, 진피(陳皮)추출물의 주요 성분을 분석하기 위해 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하였다. 분석 표준품은 Sigma-Aldrich(tectorigenin, tectoridin, hesperidin)와 Tokiwa Phytochemical(Chiba, Japan, tectorigenin 7-Oxylosylglucoside)에서 구입했다. 분석조건은 메탄올에 용해 후 Agilent Proshell column(C18, 2.7 μ m, 4.6 mm X 50 mm)을 사용하여 40°C에서 물과 아세트나이트릴을 이동상으로 사용하였다. 자외선 검출기로는 260 nm(tectorigenin, tectoridin, tectorigenin 7-Oxylosylglucoside)와 280 nm(hesperidin)에서 검출하였다. 그 결과 본 tectorigenin, tectoridin, tectorigenin 7-Oxylosylglucoside 3종에 대한 PCE17과 갈화(葛花) 추출물 내 총량은 73.7 mg/g, 134.9 mg/g이었으며, PCE17과 진피(陳皮) 추출물의 hesperidin은 57.5 mg/g, 146.0 mg/g의 총량을 함유하였다.

3. ER- β /ERE 293T 세포의 리포터 유전자 분석

HEK293T(Invitrogen, USA) 세포는 10% Fetal Bovine Serum(FBS, Thermo Fisher Scientific, USA)을 이용하여 24-well plates(6×10^4 cell/well)에 분주한 뒤, 다음날 5% charcoal-stripped FBS(Sigma-Aldrich)를 포함한 phenol, red-free DMEM(Thermo Fisher Scientific)으로 교체하였다. 그 후, human ER- β 발현벡터, ERE(estrogen response elements)를 포함한 firefly luciferase 리포터 벡터와 Renilla luciferase control 리포터 벡터를 co-transfection 하였다. 4시간 후, DMSO, PCE17(12.5, 25, 50 μ g/ml), 갈화(葛花, 28 μ g/ml), 진피(陳皮, 22 μ g/ml) 또는 E2(1 ng/ml)를 24시간 동안 처리하였다. 리포터 유전자 활성은 Dual-Luciferase® reporter(DLR™) assay system(Promega, USA)을 이용하여 측정하였다.

4. MCF-7 세포 배양 및 에스트로겐 활성평가

MCF-7 세포는 10%, FBS를 함유한 DMEM으로 24-well plates(1×10^5 cell/well)에 분주하였다. 24시간 배양 후 5% charcoal-stripped FBS를 포함한 phenol red-free DMEM으로 교체하였으며 PCE17(25, 50, 100 μ g/ml), 갈화(葛花, 14, 28, 57 μ g/ml), 진피(陳皮, 11, 22, 43 μ g/ml), tectorigenin (1.25, 2.5, 5 μ g/ml) 또는 E2(1 ng/ml)로 처리 후, 5일간 배양하여 CCK-8(Cell Counting Kit-8, Dojindo Molecular Technologies, USA)용액을 처리하여 증가된 세포의 개수로 에스트로겐 활성을 평가하였다. 또한 에스트로겐 활성에 의한 특정 유전자와 단백질 발현을 확인하기 위하여 MCF-7 세포를 24-well plates(2.5×10^5 cell/well) 또는 6-well plates(1×10^6 cell/well)에 배양 후, 각각의 시료를 24시간 동안 처리하고 RT-PCR과 western blot을 실시하였다. RT-PCR의 경우, RNeasy Mini Kit(Qiagen, USA)를 사용

총 RNA를 분리하고, cDNA 합성 Kit(Phile Korea, Korea)로 cDNA를 합성하였다. 그 후, pS2 유전자(Hs00907239_m1) 또는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH, Hs02758991_g1)에 대한 TaqMan probe(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 수행하였으며 데이터는 GAPDH로 보정된 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 값과 DMSO 처리 군과 비교하여 유의차를 분석하였다. Western blotting의 경우, lysis buffer로 세포를 용해 후, NuPAGE® LDS 샘플 버퍼(Thermo Fisher Scientific)와 함께 4-15% Mini-PROTEAN® TGXTM Presta Protein Gels(Thermo Fisher Scientific)에 전기 영동하였다. 전기 영동한 젤을 PVDF막으로 옮긴 후, 5% BSA 5%, TBS 0.05% TWEEN 20을 포함한 용액을 처리하여 비특이적 단백질이 붙는 것을 방지하였다. PVDF막은 pS2 항체(sc-271464, Santa Cruz, USA) 또는 GAPDH 1차 항체(sc-47724, Santa Cruz, USA)로 반응시키고 horseradish peroxidase가 붙어있는 2차 항체를 처리 후 Amersham ECL Plus Western Blotting ECL 용액(GE Healthcare Bio-Sciences, USA) 으로 단백질의 발현정도를 측정하였다.

5. 파골세포 배양 및 분화억제

쥐 골수에서 추출한 파골 전구세포를 Cosmo Bio사(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 파골 전구세포는 24-well plates(8×10^4 cells/well)에 분주한 뒤, M-CSF(10 ng/ml)와 RANKL(10 ng/ml)를 이용하여 분화를 유도하였으며 PCE17 (2.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 갈화(葛花, 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 진피(陳皮, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), E2(10 ng/ml)를 동시에 처리하였다. 3일간 배양한 후, TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) 키트(MK300, Takara, Japan)용액으로 세포를 염색하여 현미경으로 관찰하였다. RT-PCR의 경우, Nfatc1 유전자(Rn04280453_m1), Ctsk 유전자(Rn00580723_m1), Acp5 유전자(Rn00569608_m1) 또는 GAPDH 유전자(R01775763_g1)에 대한 TaqMan probe(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 GAPDH로 보정된 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 값과 DMSO 처리 군과 비교하여 유의차를 분석하였다.

6. 통계분석

각각의 실험군은 3번 이상 반복 수행하였고 결과는 평균 \pm 표준 편차로 나타내었다. 결과 사이의 통계적 유의성은 독립적인 t-테스트를 사용하였으며 통계적 차이는 $p < 0.05$ 일 때 유의적인 것으로 간주 되었다.

III. 결 론

1. PCE17의 ER- β /ERE 리포터 유전자 활성효과

에스트로겐은 세포질 내 에스트로겐 수용체(ER)에 결합한 뒤 에스트로겐/ER 복합체 형태로 핵 내로 이동, ERE에 결합하여 표적 유전자 발현을 조절한다²⁰. 따라서 PCE17이 ER과 ERE 사이의 상호작용을 조절하는지 알아보하고자, ER- β /ERE 리포터

유전자를 이용하여 HEK293T 세포에서 루시페린의 발광정도를 평가하였다. PCE17를 처리한 결과, ER- β /ERE 리포터 유전자에 의한 루시페린의 발광정도는 용량의존적인 방식으로 증가하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 가장 높은 활성효과를 보였다. 복합물인 PCE17에 포함된 각각의 추출물 효과를 알아보하고자 PCE17의 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 포함된 갈화(葛花, 28 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 진피(陳皮, 22 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 대해 평가한 결과, 갈화(葛花)에서 PCE17과 유사한 활성도를 보였으며, 진피(陳皮)는 상대적으로 갈화(葛花)보다 낮아 PCE17의 효과는 주로 갈화(葛花)에 의한 것으로 판단된다(Fig. 1).

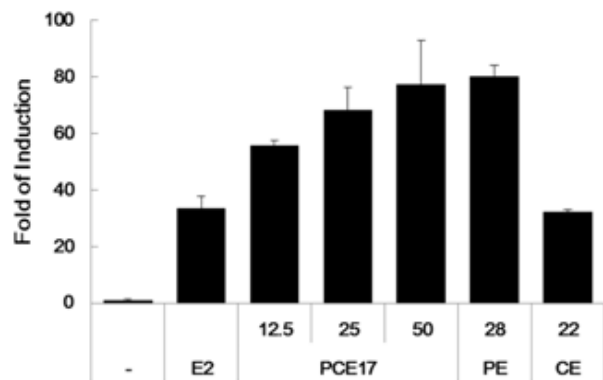


Fig. 1 Induction of the ER- β /ERE reporter gene activity in 293T cells. HEK293T cells were transfected with an expression vector for the human estrogen receptor- β , a firefly luciferase reporter vector for ERE, and with a Renilla luciferase control reporter vector to correct for transfection efficiency. Cells were then treated for 24 h with a control DMSO vehicle (-), E2 (1 ng/ml), PCE17 (12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), PE (28 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or CE (22 $\mu\text{g}/\text{ml}$), as indicated. Cells were lysed and assayed for luciferase activity. The results shown are the fold induction relative to the vehicle-treated (-) cells. The results are presented as the mean \pm SD.

2. PCE17의 에스트로겐 활성효과

Daidzein, equol과 같은 피토에스트로겐은 에스트로겐의 존성 MCF-7 세포 내 ER에 결합하여 세포 성장을 촉진하고 pS2 발현을 증가 시킨다²¹. 또한 pS2 유전자는 에스트로겐 반응성 대표 유전자로, PCE17이 ER에 결합 후, 일련의 신호 전달을 통하여 MCF-7 세포의 증식과 pS2 유전자 발현을 유도하는지 확인하고자 하였다. ER- β /ERE 리포터 유전자의 활성효과가 높았던 PCE17과 갈화(葛花)의 처리는 MCF-7 세포 증식을 크게 유도하였고(Fig. 2A), 갈화(葛花)의 주 성분인 tectorigenin도 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도부터 최대효과를 보였다(Fig. 2B).

추가적으로 에스트로겐 반응성 유전자인 pS2의 mRNA와 단백질의 발현을 알아보하고자 RT-PCR과 western blotting을 실시한 결과, PCE17과 갈화(葛花), tectorigenin의 처리는 MCF-7 세포 증식결과처럼 농도 의존적으로 최대 3배까지 증가를 확인하였다(Fig. 3A, 3B, 3C). 그러나 진피(陳皮)는 ER- β /ERE 리포터 유전자의 활성과 달리 MCF-7 세포의 증식에는 아무런 영향을 미치지 않았다.

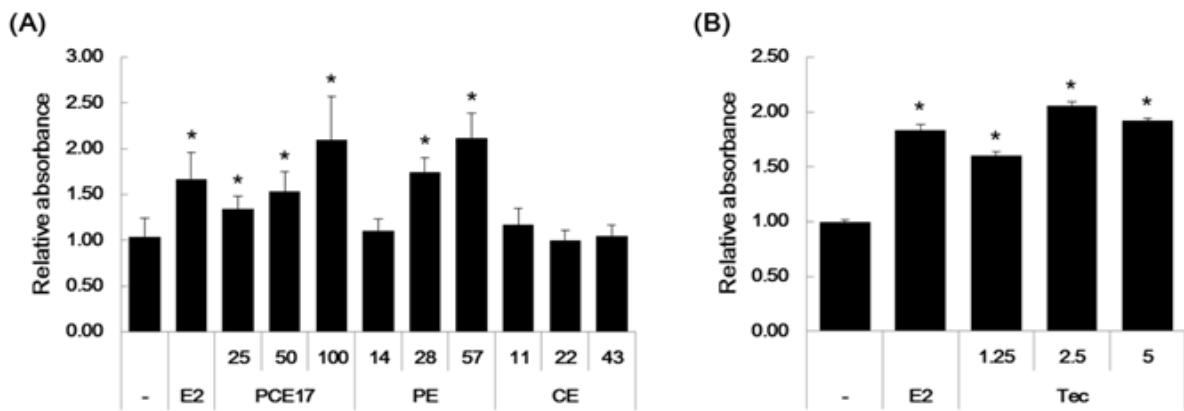


Fig. 2 Estrogenic activity in MCF-7 cells. MCF-7 cells were treated (A) with a control DMSO vehicle (-), E2 (1 ng/ml), PCE17 (12.5, 25, 50 µg/ml), PE (14, 28, 57 µg/ml), CE (11, 22, 43 µg/ml) or (B) with a control DMSO vehicle (-), E2 (1 ng/ml), or Tec (1.25, 2.5, 5 µg/ml) for five days. The proliferation of MCF-7 cells was then determined with a CCK-8 assay. The results shown are the absorbance at 450 nm relative to the vehicle-treated (-) cells. The results are presented as the mean \pm SD, and significant differences are indicated as compared to the vehicle-treated (-) cells, $*p < 0.05$.

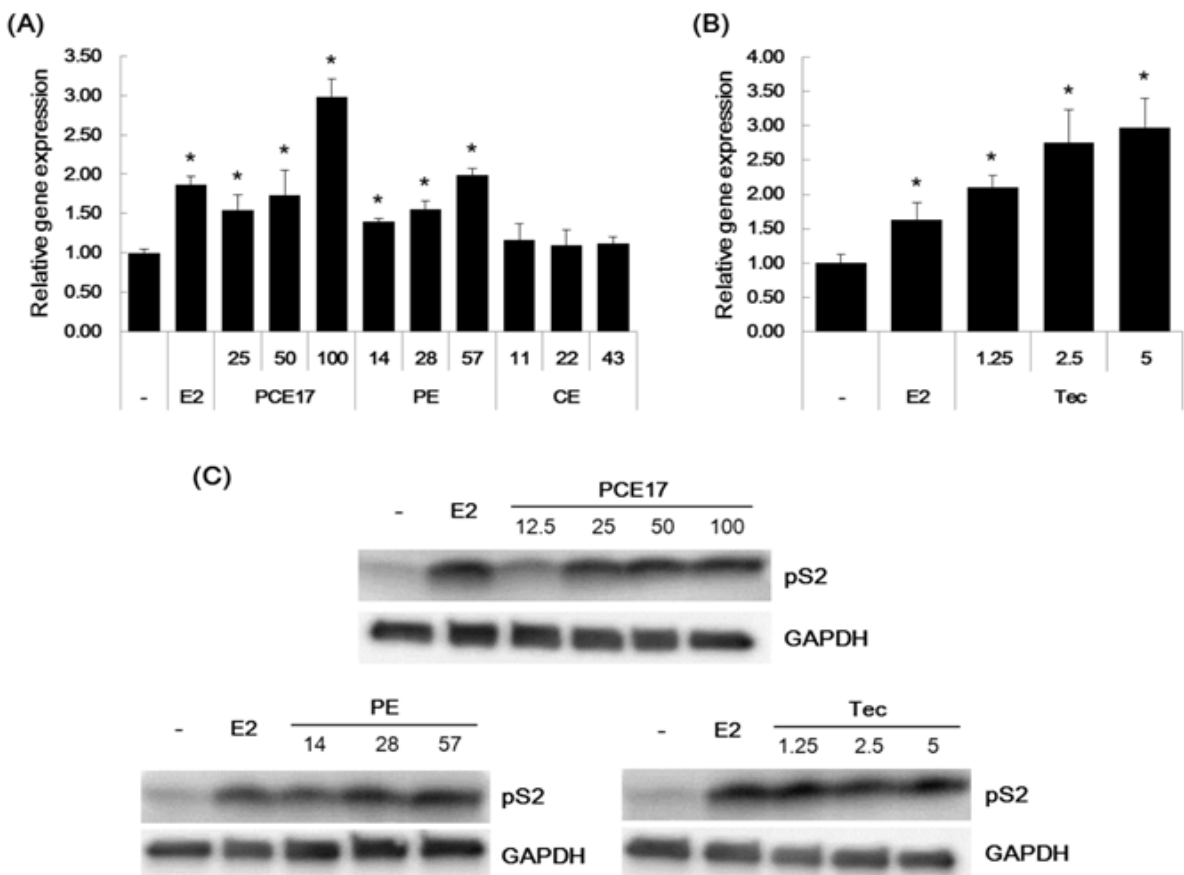


Fig. 3 Effect of PCE17 on estrogen-responsive gene in MCF-7 cells. MCF-7 cells were treated with a control DMSO vehicle (-), E2 (1 ng/ml), PCE17 (12.5, 25, 50 µg/ml), PE (14, 28, 57 µg/ml), CE (11, 22, 43 µg/ml) or Tec (1.25, 2.5, 5 µg/ml) for 24 h. The expression level of pS2 was evaluated by (A, B) real-time PCR or (C) western blotting. The results are presented as the mean \pm SD, and significant differences are indicated as compared to the vehicle-treated (-) cells, $*p < 0.05$.

3. PCE17의 파골세포 형성 억제효과

에스트로겐 결핍으로 인해 폐경여성은 골다공증에 걸릴 가능성이 높다²²⁻²³⁾. 따라서 에스트로겐 활성효과가 높았던 PCE17, 갈화(葛花), 진피(陳皮)의 RANKL 유도 파골세포 분화억제 여부를 확인하고자, 파골세포 전구세포에 RANKL 및

M-CSF와 공동으로 처리하였다. 3일 후, RANKL 및M-CSF 처리한 대조군에서는 분화된 다핵 파골세포가 관찰되었으나, PCE17(2.3 µg/ml)와 진피(陳皮, 1.0 µg/ml), 그리고 E2(10 ng/ml)를 처리한 경우, 다핵 파골세포로 분화가 억제되었으며 (Fig. 4A), 갈화(葛花, 14 µg/ml)는 진피(陳皮)보다 높은 농도로 처리해야 다핵 파골세포 분화 억제에 효과를 보였다(Fig. 4B).

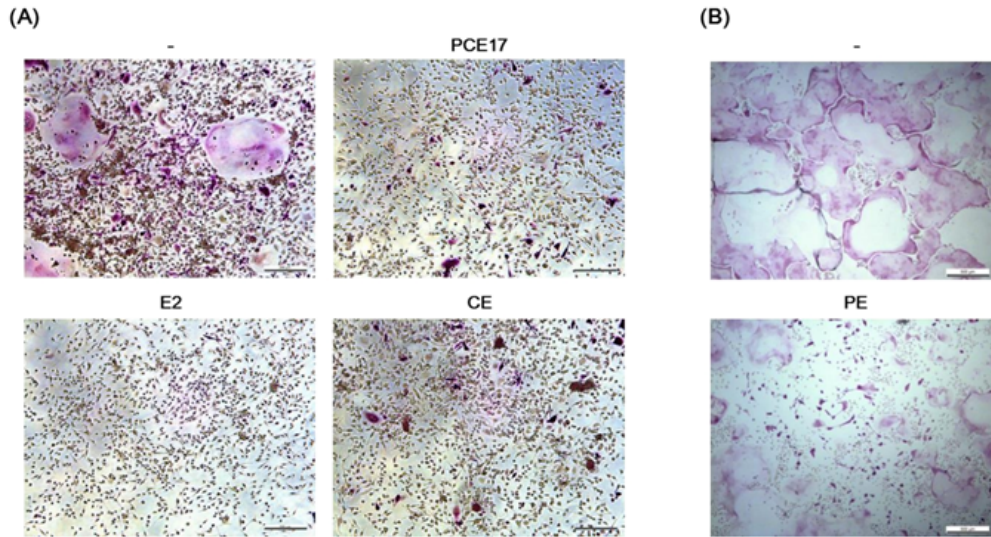


Fig. 4 Inhibition of osteoclast differentiation by PCE17 in rat primary cultured cells. Primary precursor osteoclasts from rat bone marrow were cultured with M-CSF (10 ng/ml) and RANKL (10 ng/ml) for three days in the presence of (A) E2 (10 ng/ml), PCE17 (2.3 μg/ml), CE (1.0 μg/ml) (B) or PE (14 μg/ml). The osteoclast differentiation was observed through TRAP staining (Scale bar= 200 μm at A, 500 μm at B).

4. PCE17의 RANKL 자극 파골세포 유도인자 억제효과

RANKL에 의해 유도된 NFATc1은 파골세포의 분화에 가장 핵심적인 요소이다. 유도된 전사인자 NFATc1은 파골세포와 관련된 특정 유전자들의 발현을 순차적으로 유도하며 최종적으로 파골세포 분화를 조절하는 기능을 한다²⁴⁻²⁵. 대표적으로 Ctsk 유전자는 뼈의 흡수역할과 관련된 효소 Cathepsin K의 발현을 담당하며, 분화된 파골세포의 면역화학적 마커로 많이 사용하는 TRAP 단백질의 유전자인 Acp5는 파골세포 분화에 매우 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다²⁶. 따라서 파골세포 분화억제에 효과적이었던 PCE17과 진피(陳皮)가 이들 유전자에 대해 미치는 효과를 확인하고자 mRNA 발현정도를 RT-PCR 방법으로 검증하였다. RANKL 처리는 파골세포 관련 유전자의 발현을 크게 증가시켰으나, 파골세포 분화억제 대조군으로 사용한 E2는 NFATc1, Ctsk, Acp5의 mRNA 발현을 상당히 억제하였다. 또한, PCE17 처리는 NFATc1, Ctsk와 Acp5 유전자들의 발현을 농도 의존적으로 감소시켜 2.3 μg/ml 처리 시, 가장 좋은 결과를 보였다. 다핵 파골세포 분화억제능을 보인 진피(陳皮)도 PCE17에 비해 약한 수준이나, 3가지 유전자들에 대해 농도 의존적으로 모두 억제효과를 보였다 (Fig. 5A, 5B, 5C).

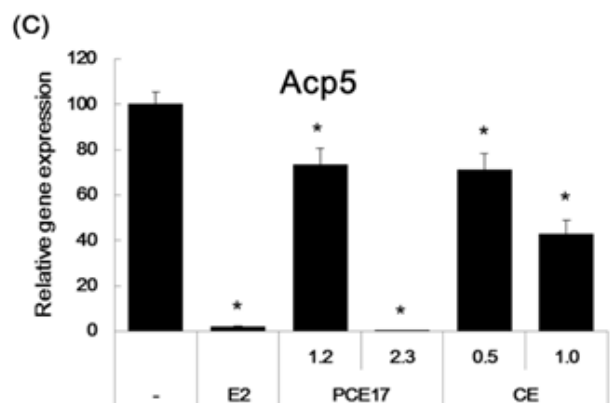
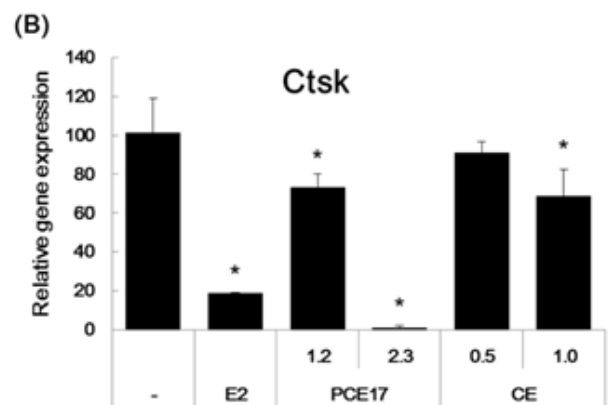
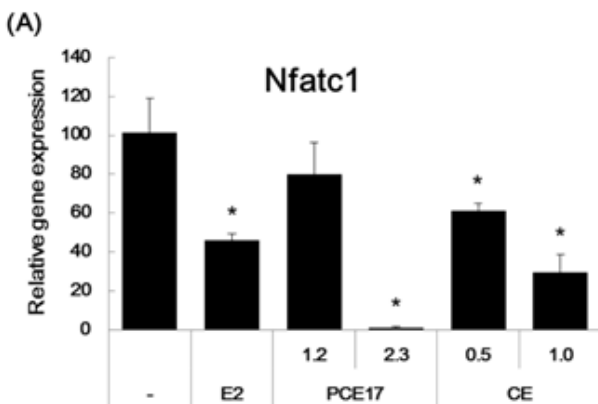


Fig. 5 Inhibitory effects of PCE17 on osteoclast-specific gene expression. Primary precursor osteoclasts from rat bone marrow were cultured with M-CSF (10 ng/ml) and RANKL (10 ng/ml) for three days in the presence of E2 (10 ng/ml), PCE17 (1.2, 2.3 μg/ml) or CE (0.5, 1.0 μg/ml). Relative gene expression levels of Nfatc1 (NFATc1), Ctsk (cathepsin K), and Acp5 (TRAP) were analyzed by real-time PCR. The results are presented as the mean ± SD, and significant differences are indicated as compared to the vehicle-treated (-) cells, *p < 0.05.

IV. 고 찰

갱년기 여성의 대부분은 에스트로겐의 결핍으로 안면홍조, 불면, 우울증 등 여러 증상이 발생되는데, 시간이 한참 지나 인지하게 되는 골다공증은 빈번한 골절 등, 고령의 삶의 질을 상당히 떨어뜨리며 정상적인 삶을 이어갈 수 없게 한다. 현재 임상적으로 Bisphosphonate 계열의 약제가 가장 많이 사용중이나²⁷⁾ 노령에서의 부정맥 유발, 하악골 괴사와 같은 부작용²⁸⁾과 지속적 사용 시 효능 저하²⁹⁾ 등이 보고되어 사용에 주의할 요하고 있는 실정이다. 이러한 부작용으로 위험성이 적고 효과도 좋은 천연물소재 연구가 활발하게 진행되어 우슬, 부자/육계, 녹각, 산수유 등의 파골세포 분화조절효과와 난소적출 동물모델에서 골다공증 억제기능이 보고된 바 있다³⁰⁻³³⁾. 본 실험적 연구 대상 한약소재의 본초학적 효능군에 입각해서 분류하면, 갈화(葛花)는 性味が 甘涼하고 脾胃에 歸經하는 解表藥중 發散風熱藥에 속하며, 진피(陳皮)는 性味が 辛苦溫하고 脾肺에 歸經하는 理氣藥에 속한다. 이들의 효능을 한의학 이론으로 해석하면, 인체의 불평한 邪氣를 소화기능을 보살피면서 發汗을 통하여 배설하는 효능으로 설명되어질 수 있다. 구체적으로는 인체에 불리한 조건인 邪氣를 없애주는 효율적인 방법 중의 하나인 發汗을 통해서 인체균형을 유지시키는 기전인 陰陽平衡에 접근하는 것이다. 본 저자는 이전 동물실험을 통하여 안면홍조와 골다공증에 효과적이었던 PCE17과 각각의 갈화(葛花), 진피(陳皮)에 대하여 세포수준에서 정확한 기전과 관여인자를 파악하고자 에스트로겐 활성과 파골세포 분화억제 모델을 이용하여 연구하였다. 여성호르몬인 에스트로겐은 세포질의 ER에 결합하면 에스트로겐/ER 복합체형태로 핵으로 이동하여 ERE에 작용한 다음 표적 유전자의 발현을 조절한다. 따라서 이를 확인하기 위하여 HEK293T 세포의 ER-β/ERE 리포터 유전자를 이용하여 PCE17과 갈화(葛花), 진피(陳皮)의 에스트로겐 수용체 결합 활성효과를 측정 한 결과, PCE17과 갈화(葛花)는 용량 의존적으로 증가시킨 반면, 진피(陳皮)는 상대적으로 활성이 낮았다. 또한 에스트로겐 의존성 MCF-7 세포에서 PCE17의 세포 증식 촉진효과와 에스트로겐 반응성 유전자 pS2의 발현 수준을 확인하였으며, 갈화(葛花)와 그 주요 성분인 tectorigenin도 상당한 에스트로겐 활성을 보여주고 있는데, 이는 본 저자의 이전 동물 연구결과와 일치한다. 그러나 진피(陳皮)는 MCF-7 세포의 증식에는 아무런 영향을 미치지 않았는데, 이는 사용한 세포들의 세포 내 ER 표발현 수준의 차이로 판단된다. 인위적 과발현 모델인 HEK293T 세포에 비해 MCF-7 세포의 상대적 낮은 수준의 ER은 진피(陳皮)의 세포증식 활성효과를 유발하기에 불충분했을 것으로 판단된다. 그러나 이전의 난소적출 동물모델 연구에서 진피(陳皮)의 효과는 PCE17과 갈화(葛花)의 효과와 비슷하여 에스트로겐 결핍에 따른 표면온도변화를 회복시켰다. 이와 같은 진피(陳皮)의 동물 효과는 반복적인 섭취에 의한 에스트로겐 활성의 체내누적 효과일 수도 있다.

RANKL에 의해 유도된 NFATc1는 파골세포의 분화에 핵심적인 전사인자로, 유도된 이후 TRAP, calcitonin 수용체, cathepsin K, 그리고 β3 integrin 과 같은 많은 파골세포 유전자를 순차적으로 조절한다. Cathepsin K는 뼈의 리모델링과 재흡수에 관여하는 단백질분해 효소이며, TRAP은 파골세포

분화마커로 Acp5 유전자를 통하여 발현된다. 따라서, PCE17과 갈화(葛花), 진피(陳皮)의 RANKL 유도 다핵 파골세포의 분화억제에 대한 효과를 확인하고자 TRAP 염색법을 실시한 결과, PCE17과 진피(陳皮)의 처리는 파골세포 전구세포의 분화를 상당한 수준으로 억제 하였으며, 갈화(葛花)는 진피(陳皮)에 비해 상대적으로 높은 농도인 14 μg/ml 처리 시 골세포분화 억제 작용을 하였다. 추가적으로 파골세포 분화 유전자, Ctsk, Nfatc1 및 Acp5에 대한 작용을 알아본 결과, PCE17는 2.3 μg/ml 처리 시 가장 효과가 좋았으며 진피(陳皮)도 모든 유전자에 대해 발현수준을 억제하였다.

한편 한의학에서 六經辨證인 少陽經證에 해당되는 갱년기 질환은 口苦, 咽乾, 目眩, 胸脇苦滿, 寒熱往來를 주 증상으로 하고 있다. 본 실험적 연구에서 활용된 갈화(葛花)와 진피(陳皮)의 혼합은 갈화(葛花)의 涼한 성질과 진피(陳皮)의 溫한 성질을 통하여 寒熱往來의 발현 주증상인 안면홍조에 대처할 수 있는 가능성을 가지고 있다. 또한 두 가지 약제 모두 부수적으로 발생할 개연성을 가지고 있는 소화 장애에 대하여 소화기관인 脾(脾)에 歸經하고 있다는 점에서 더욱 가능성을 높이고 있다. 이러한 효능은 갱년기에 나타나는 호르몬역조현상의 결과인 골다공증에 대한 예비조치로서의 가능성 역시 가지고 있다고 설명될 수 있다.

본 실험적 연구의 결과와 한의 본초학 이론 견해의 상관성을 살펴보면, 갈화(葛花), 진피(陳皮)는 결론적으로, PCE17은 에스트로겐 수용체에 결합을 통하여 에스트로겐 특정 유전자 pS2발현을 유도하고 활성작용을 하며, RANKL 유도 다핵 파골세포의 분화억제에 대해서도 상당히 효과적임을 확인하였다. PCE17의 이러한 효과는 RANKL에 유도된 Nfatc1 전사인자를 효과적으로 억제하여, 순차적으로 파골세포 관련 Ctsk와 Acp5 유전자 발현을 하향 조절함으로써 최종적으로 파골세포생성을 억제하는 기전을 알 수 있었다. 이와 같은 결과를 바탕으로, 에스트로겐의 활성효과가 더 우수한 갈화(葛花)와 파골세포 억제효과가 뛰어난 진피(陳皮)로 구성된 PCE17은 폐경 후 여성의 에스트로겐 결핍으로 인한 다양한 증상을 완화시킬 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

갱년기 여성의 골다공증 완화와 예방에 효과적으로 사용될 수 있는 기능성소재를 제시할 목적으로, 갈화(葛花), 진피(陳皮) 각각의 추출물과 복합물인 PCE17의 에스트로겐 활성을 알아 보았다.

또한 RANKL로 유도되는 파골세포 분화억제효과와 일련의 억제기전을 살펴본 바, 그 결과는 다음과 같다.

1. PCE17의 처리는 ER-β/ERE 리포터 유전자에 의한 루시페린의 발광정도를 용량 의존적으로 증가시켜 50 μg/ml의 농도에서 가장 높은 활성효과를 보였다. 갈화(葛花, 28 μg/ml)처리 시 PCE17과 유사한 활성도를 보였으며, 진피(陳皮)는 갈화(葛花)보다 활성효과가 낮아 PCE17의 효과는 주로 갈화(葛花)에 의한 것임을 예상할 수 있었다.

2. ER- β /ERE 리포터 유전자의 활성효과가 높았던 PCE17 과 갈화(葛花)의 처리는 MCF-7 세포 증식을 크게 유도하였고(Fig. 2A), 갈화(葛花)의 주요 성분인 tectorigenin 도 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도부터 최대효과를 보였다(Fig. 2B). 또한 pS2의 mRNA와 단백질의 발현을 최대 3배까지 증가시켜 PCE17과 갈화(葛花)의 에스트로겐 활성기능을 확인하였다.
3. RANKL 유도 파골세포 분화를 PCE17(2.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 진피(陳皮, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리한 경우, 다핵 파골세포로 분화가 억제되었으며, 갈화(葛花, 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$)는 진피(陳皮)보다 높은 농도를 처리해야 다핵 파골세포 분화 억제 효과를 보였다.
4. PCE17 처리는 RANKL 유도 파골세포 분화 관련 NFATc1, Ctsk와 Acp5 유전자들의 발현을 농도 의존적으로 감소시켜 2.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 시, 가장 좋은 결과를 보였다. 다핵 파골세포 분화 억제능을 보인 진피(陳皮)도 PCE17에 비해 약한 수준이나, 3가지 유전자들에 대해 농도 의존적으로 모두 억제효과를 보였다

References

1. Neugarten BL, Kraines RJ. "Menopausal symptoms" in women of various ages. *Psychosom Med.* 1965 ; 27 : 266-73.
2. Grady D. Management of menopausal symptoms. *N Engl J Med.* 2006 ; 355 : 2338-47.
3. Writing Group for the Women's Health Initiative I : Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women : principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002 ; 288 : 321-33.
4. Lobo RA. Benefits and risks of estrogen replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol.* 1995 ; 173 : 982-9.
5. Wallach EE, Gambrell Jr RD. The menopause benefits and risks of estrogen-progestogen replacement therapy. *Fertil Steril.* 1982 ; 37 : 457-74.
6. Kronenberg F, Fugh-Berman A. Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms : a review of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med.* 2002 ; 137 : 805-13.
7. Han KK, Soares Jr JM, Haidar MA, De Lima GR, Baracat EC. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet Gynecol.* 2002 ; 99 : 389-94.
8. Jiang RW, Lau KM, Lam HM. A comparative study on aqueous root extracts of *Pueraria thomsonii* and *Pueraria lobata* by antioxidant assay and HPLC fingerprint analysis. *J Ethnopharmacol.* 2005 ; 96 : 133-8.
9. Wang Q, Cheng XL, Li H. Application of an efficient strategy for discovery and purification of bioactive compounds from Chinese herbal medicines, a case study on the *Puerariae thomsonii* Flos. *J Pharm Biomed Anal.* 2013 ; 75 : 25-32.
10. Yamazaki T, Hosono T, Matsushita Y. Pharmacological studies on *Puerariae* Flos. IV : Effects of *Pueraria thomsonii* dried flower extracts on blood ethanol and acetaldehyde levels in humans. *Int J Clin Pharmacol Res.* 2002 ; 22 : 23-8.
11. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine Schools. *Herbology [Boncho-hak]*. Seoul : Young-Lim Press, 2013 ; 185 : 389-91.
12. Lu J, Xie Y, Tan Y. Simultaneous determination of isoflavones, saponins and flavones in *Flos Puerariae* by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Chem Pharm Bull.* 2013 ; c13-00271.
13. Niiho Y, Nakajima Y, Yamazaki T. Simultaneous analysis of isoflavones and saponins in *Pueraria* flowers using HPLC coupled to an evaporative light scattering detector and isolation of a new isoflavone diglucoside. *J Nat Med.* 2010 ; 64 : 313-20.
14. Kamiya T, Takano A, Kido Y. Evaluation of the estrogenic activity of *Pueraria* (Kudzu) flower extract and its major isoflavones using ER-binding and uterotrophic bioassays. *Pharmacol Pharm.* 2013 ; 4 : 255.
15. Ju YS. *Ungok Herbology*. Jeonju : Woosuk Press, 2015 ; 325.
16. Han NR, Nam SY, Hong S. Improvement effects of a mixed extract of flowers of *Pueraria thomsonii* Benth. and peels of *Citrus unshiu* Markovich on postmenopausal symptoms of ovariectomized mice. *Biomed Pharmacother.* 2018 ; 103 : 524-30.
17. Jeong HJ, Kim MH, Kim H. PCE17 and its active compounds exert an anti-osteoporotic effect through the regulation of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in ovariectomized mice. *J Food Biochem.* 2018 ; 42 : e12561.
18. Veronique H, Inge-Lise N, Angel GI, Anna T, Christine M, Winnie C, Denis B, Patrice L, Marie-Jeanne D, Gary W, Elizabeth O, Veronique C, Marie-Noelle H. Increased bioavailability of hesperetin-7-glucoside compared with hesperidin results in more efficient prevention of bone loss in adult ovariectomized rats. *Br J Nutr.* 2009 ; 102 : 976-84.
19. Tomoyasu K, Erina Y, Yayoi K, Akira T, Motoya I, Kinya T, Haruhi S. Safety Evaluation of Excessive Intake of Powdered Drink Containing *Pueraria* Flower Extract in Healthy Adults Including Obese Subjects. *Jpn Pharmacol Ther.* 2013 ; 41 : 167-82.

20. Loven MA, Wood JR, Nardulli AM. Interaction of estrogen receptors α and β with estrogen response elements. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 ; 181 : 151–63.
21. Sathyamoorthy N, Wang TTY, Phang JM. Stimulation of pS2 expression by diet-derived compounds. *Cancer Res*. 1994 ; 54 : 957–61.
22. Lindsay R. The menopause and osteoporosis. *Obstet Gynecol*. 1996 ; 87 : 16S–9S.
23. Oursler MJ. Direct and indirect effects of estrogen on osteoclasts. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2003 ; 3 : 363–6.
24. Negishi-Koga T, Takayanagi H. Ca^{2+} -NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunol Rev*. 2009 ; 231 : 241–56.
25. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007 ; 40 : 251–64.
26. Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008 ; 41 : 218–23.
27. Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugal N, Yamamoto M, Nagata N. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone*. 1996 ; 18 : 9–14.
28. Abrahamsen B. Bisphosphonate adverse effects, lessons from large databases. *Curr Opin Rheumatol*. 2010 ; 22(4) : 404–9.
29. Silverman SL, Lane NE. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2009 ; 7(1) : 23–6.
30. Kim JH, Kim JY, Ann JY, Park HJ, Kim HJ, Kwak HB, Oh JM, Kim YK. Inhibitory Effects of *Achyranthis Bidentatae Radix* on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption. *Kor J Herbology*. 2010 ; 25(1) : 65–74.
31. Jung GE, Kim JY, Kim JH, Han SY, Park HJ, Kim YK. Effects of Co-administration of *Aconiti Lateralis Preparata Radix* and *Cinnamomi Cortex* on Osteoclast Differentiation. *Kor J Herbology*. 2014 ; 29(2) : 61–7.
32. Hwang JS, Seo BI, Park JH, Roh SS, Kim MY, Kim SM, Goo JS. Effect of *Cervi Cornu* On treatment of Osteoporosis in Ovariectomized Rats. *Kor J Herbology*. 2010 ; 25(2) : 1–10.
33. Joo SJ, Park JH, Seo BI. Effects of Korean *Corni Fructus* On treatment of Osteoporosis In Ovariectomized Rats. *Kor J Herbology*. 2007 ; 22(2) : 83–95.